



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : A61K 39/21, C07K 16/10; A61K 39/42, 47/48 // C12N 15/00	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/27389 (43) Date de publication internationale: 12 septembre 1996 (12.09.96)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/00357 (22) Date de dépôt international: 7 mars 1996 (07.03.96) (30) Données relatives à la priorité: 95/02708 8 mars 1995 (08.03.95) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): NEOVACS [FR/FR]; 117, rue Vieille-du-Temple, F-75003 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): ZAGURY, Jean-François [FR/FR]; 117, rue Vieille-du-Temple, F-75003 Paris (FR). BIZZINI, Bernard [FR/FR]; 19, rue d'Elancourt, La Verrière, F-78320 Le Mesnil-Saint-Denis (FR). ZAGURY, Daniel [FR/FR]; 1, rue Frédéric-Le-Play, F-75007 Paris (FR). (74) Mandataire: RINUY, SANTARELLI; 14, avenue de la Grande-Armée, Boîte postale 237, F-75822 Paris (FR).	(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>	

(54) Title: NON-TOXIC IMMUNOGENS DERIVED FROM A RETROVIRAL REGULATORY PROTEIN, ANTIBODIES, PREPARATION METHOD THEREFOR, AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CONTAINING SAME

(54) Titre: IMMUNOGENES DENUES DE TOXICITE DERIVANT D'UNE PROTEINE DE REGULATION RETROVIRALE, ANTICORPS, PROCEDE DE PREPARATION ET COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES LES RENFERMANT

(57) Abstract

An immunogenic compound that, being non-toxic, may be administered to humans, and is derived from an HIV-1, HIV-2, HTLV-1 or HTLV-2 virus regulatory protein by chemical processing using a coupling agent such as an aldehyde, or from a carrier protein activated by pre-processing using an aldehyde, whereby said compound may be recognised by antibodies to said regulatory protein, and retain sufficient immunogenic properties to produce antibodies that neutralise or block the native protein, while losing at least 50 % of the toxic biological properties of said native protein.

(57) Abrégé

Composé immunogène administrable à l'homme car dénué de toxicité, dérivant d'une protéine de régulation d'un virus VIH-1, VIH-2, HTLV-1 ou HTLV-2, par traitement chimique à l'aide d'un agent de couplage tel qu'un aldéhyde, ou d'une protéine porteuse activée par un pré-traitement à l'aide d'un aldéhyde, lui permettant d'être reconnu par des anticorps dirigés contre ladite protéine de régulation, et de conserver des propriétés immunogènes suffisantes pour créer des anticorps neutralisant ou bloquant ladite protéine native, tout en ayant perdu au moins 50 % des propriétés biologiques toxiques de ladite protéine native.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroon	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

Immunogènes dénués de toxicité dérivant d'une protéine de régulation rétrovirale, anticorps, procédé de préparation et compositions pharmaceutiques les renfermant

La présente invention concerne de nouveaux immunogènes rétroviraux utilisant des protéines de régulation rétrovirales dont les propriétés biologiques essentielles auront été préalablement inactivées de façon telle que l'on conserve ou augmente leurs propriétés immunogènes, leur procédé de
5 préparation et des compositions pharmaceutiques les renfermant. Ces nouveaux immunogènes "inactivés" peuvent être utilisés pour induire chez l'homme une immunisation active susceptible de prévenir ou corriger les effets de dérégulation que les protéines natives dont ils sont issus peuvent contribuer à produire.

10 De même, la présente invention concerne de nouveaux anticorps obtenus par l'utilisation de ces immunogènes "inactivés", leurs procédés de préparation et les compositions pharmaceutiques les contenant en vue d'une immunisation passive.

La molécule Tat est une protéine de régulation du VIH que l'on ne
15 trouve pas dans la particule virale mais qui est codée par le génome du VIH-1. A l'intérieur des cellules infectées, cette protéine codée par l'ADN proviral joue un rôle transactivateur de gènes viraux ou cellulaires. Cette protéine de régulation génétique peut cependant se trouver également à l'extérieur des cellules dans le milieu circulant extracellulaire, excrétée au sein de débris de
20 cellules mortes à l'état natif ou fragmentaire ou par processus de sécrétion. Sa présence dans le milieu circulant explique l'existence d'anticorps anti-Tat détectables chez certains sujets séropositifs. Dans ce contexte extracellulaire du Tat le segment C terminal porteur des résidus RGD reconnus par les
25 intégrines de surface cellulaire et la région basique de la molécule (résidus 45 - 70) vont lui permettre, comme le font les toxines bactériennes, d'agir sur les cellules non infectées de différents tissus. Ainsi la protéine Tat circulante agissant comme une véritable toxine virale, peut exercer des effets nocifs sur les cellules endothéliales et en association avec le facteur de croissance BFGF, contribuer à la néoangiogenèse du Sarcome de Kaposi caractérisant la maladie
30 Sida. La protéine Tat circulante peut également aggraver l'immunosuppression qui s'installe progressivement dans le Sida, soit par action immunosuppressive

directe sur les cellules T soit en contribuant à dérégler la production d'interféron α par les cellules présentant d'antigène, appelées APC (macrophages ou cellules dendritiques).

Le syndrome d'immunodéficience acquise (Sida) est cliniquement
5 défini par des maladies opportunistes dues à une immunosuppression ou par le Sarcome de Kaposi. L'immunosuppression acquise, d'installation progressive au cours de l'infection VIH, se manifeste biologiquement par la perte de réactivité immunologique des cellules T (cytostase et la diminution de production de l'IL2) après stimulation en premier lieu par les antigènes de
10 rappel, puis par les alloantigènes et enfin par les mitogènes (PHA). Cette immunosuppression est associée à la surproduction des interférons α et γ .

Les mécanismes cytopathogènes qui induisent l'immunosuppression sont complexes et font intervenir différents facteurs d'origine virale agissant soit directement sur les cellules de l'immunité,
15 lymphocytes T et APC, soit indirectement via le réseau des cytokines. Ainsi la protéine d'enveloppe gp120 portée par la particule de VIH-1 et dont la présence extracellulaire est mesurée par la charge virale sérique peut induire directement l'anergie de cellules T de phénotype CD4. De leur côté les protéines de régulation du VIH, notamment le Tat, dans sa configuration
20 extracellulaire de toxine virale circulante, semblent également induire une immunosuppression directe des cellules T ou d'autres effets pathogènes, du fait par exemple qu'in vitro les cellules T activées par un antigène de rappel ou par des anticorps anti-CD3 ne prolifèrent plus en présence de la molécule Tat. En outre la protéine Tat circulante semble faciliter la surproduction par les APC
25 d'interféron α , cytokine cytostatique et apoptogène susceptible d'amplifier l'immunosuppression et l'apoptose observés dans la maladie Sida. En effet la sécrétion d'interféron α par les macrophages ne semble plus, en présence de Tat, arrêtée par une rétrorégulation (feedback) qui à l'état normal contrôle cette production d'interféron α (période réfractaire).

30 Le Sarcome de Kaposi se manifeste cliniquement par l'apparition de nodules vasculaires représentant une néoangiogenèse constituée à partir

de cellules endothéliales. Ces cellules activées par des processus inflammatoires engendrant la production de cytokines (interféron γ , IL1 et IL6) produisent du BFGF (Basic Fibroblastic Growth Factor) et se multiplient. La prolifération des cellules endothéliales activées in vitro est augmentée par la présence dans le milieu de la protéine Tat. Les anticorps anti-Tat bloquent in vitro les effets prolifératifs de la protéine Tat. L'action du Tat sur les cellules endothéliales porteuses à leur surface d'adhésine de la famille des Intégrines s'explique par la présence de la séquence RGD reconnue par ces molécules.

La néoangiogenèse qui sous-tend in vivo le sarcome de Kaposi serait donc favorisée par la protéine de régulation Tat dans sa configuration extracellulaire, qui pourrait être reconnue, grâce à son fragment C terminal contenant la séquence RGD, par les intégrines des cellules endothéliales. De plus le Tat pourra également agir par sa région basique riche en résidus K et R, et par conséquent susceptible de se lier à l'héparine sulfate de la matrice extracellulaire qui concentre le facteur de croissance BFGF. Ainsi la prolifération des cellules endothéliales induite par les facteurs de croissance est accrue par la présence de Tat et engendre la néoangiogenèse. Cet effet sur la croissance des cellules endothéliales est réduit in vitro par l'action d'anticorps anti-Tat.

Il apparaît donc souhaitable de bloquer l'activité nocive des protéines de régulation des rétrovirus, notamment du Tat circulant dans les milieux extracellulaires (sang, lymphe, milieux interstitiels ...), véritables toxines virales.

En ce qui concerne les virus VIH, on avait jusqu'à présent effectué des tentatives de vaccination à l'aide de protéines de structure ou fragments de protéines de structure de ces virus, mais jamais à l'aide de protéines de régulation ou fragments de protéines de régulation de ces virus.

Or, on a trouvé avec étonnement que, tout comme les toxines bactériennes (tétanique, diphtérique ou botulique) dont l'activité toxique est neutralisée par des anticorps spécifiques, les effets nocifs des protéines virales de régulation et notamment du Tat, véritable toxine du VIH dans sa

configuration extracellulaire - qu'ils s'exercent par l'immunosuppression des cellules T, par le dérèglement de la production de l'interféron α par les APC ou par la néoangiogenèse qui sous-tend le Sarcome de Kaposi - sont abolis en présence d'anticorps spécifiques anti-Tat, comme on le verra ci-après dans la

5 partie expérimentale.

Il en est de même avec d'autres protéines de régulation de virus tels que VIH-1, VIH-2, HTLV-1 ou HTLV-2. Il serait donc souhaitable de disposer d'immunogènes administrables à l'homme capables de produire de tels anticorps, de même que disposer de tels anticorps, à des fins tant curatives

10 que préventives. En effet les composés de l'art antérieur utilisés comme immunogènes peuvent être toxiques pour l'homme (voir par exemple WO-A-9118454), notamment ceux comportant les régions basiques. Il s'agit de fragments non modifiés de Tat, de Nef ou de Rev "natifs", contrairement à la présente invention basée sur l'inactivation de ces protéines ou fragments de

15 protéines.

C'est pourquoi la présente demande a pour objet des composés immunogènes administrable(s) à l'homme car dénué(s) de toxicité, caractérisés en ce qu'ils dérivent d'une protéine de régulation d'un virus VIH-1, VIH-2, HTLV-1 ou HTLV-2, par traitement chimique à l'aide d'un agent de couplage tel

20 qu'un aldéhyde, ou d'une protéine porteuse activée par un pré-traitement à l'aide d'un aldéhyde, de préférence le formaldéhyde ou le glutaraldéhyde, leur permettant d'être reconnus par des anticorps dirigés contre ladite de protéine de régulation, et de conserver des propriétés immunogènes suffisantes pour créer des anticorps neutralisant ou bloquant ladite protéine native, tout en

25 ayant perdu au moins 50%, notamment au moins 80%, particulièrement plus de 95% des propriétés biologiques toxiques de ladite protéine native.

Ces composés, par analogie aux toxoïdes bactériens tel que le tétanos toxoïde, seront qualifiés ci-après de "toxoides".

En effet, tout comme les toxoïdes bactériens classiques, ils sont

30 dépourvus de toxicité propre, mais sont cependant capables de provoquer une immunisation par administration chez un sujet.

Le traitement chimique ci-dessous peut être complété par un traitement physique comme par exemple une irradiation et tout particulièrement une irradiation U.V., dans le but de diminuer la toxicité résiduelle des composés immunogènes selon l'invention.

5 Les toxoïdes ci-dessus peuvent par exemple être préparés à partir d'un peptide ayant une séquence identique ou similaire à une séquence peptidique d'une protéine de régulation, telle que le Tat, et être obtenu par exemple par synthèse peptidique conventionnelle sur résine ou par génie génétique. Tous ces procédés sont bien connus par l'état de la technique.

10 Afin de vérifier que la protéine de régulation modifiée ou son fragment modifié selon l'invention est bien reconnu par des anticorps dirigés contre ladite protéine de régulation native, on peut par exemple vérifier immunologiquement par Elisa en présence d'anticorps spécifiques, la formation de complexes antigènes-anticorps comme on le verra ci-après dans la partie
15 expérimentale.

Afin de déterminer si les propriétés immunogènes de la protéine de régulation ont été suffisamment conservées pour créer des anticorps neutralisant ladite protéine native, on peut par exemple immuniser des mammifères (lapins, rats, souris) à l'aide d'un composé immunogène selon
20 l'invention et vérifier que les anticorps produits neutralisent les activités toxiques de la protéine de régulation, comme on le verra pour le Tat dans la partie expérimentale.

Afin de déterminer si la protéine de régulation modifiée a perdu au moins de 50% de ses propriétés biologiques toxiques, on peut par exemple
25 étudier l'effet de la protéine de régulation telle que le Tat inactivé sur l'immunosuppression des cellules T ou sur la production d'interféron α par des cellules mononucléées du sang périphérique activées ou encore sur la néoangiogenèse induite par la protéine de régulation.

L'inactivation de la protéine de régulation Tat est vérifiée par
30 exemple par le " Tat Rescue Assay " utilisant un mutant de VIH non infectieux Tat déficient cultivé sur la lignée cellulaire HLM-1 dont la réplication dépend

d'un apport exogène de Tat natif.

Le composé immunogène peut dériver d'une quelconque des protéines de régulation des virus VIH-1, VIH-2, HTLV-1 ou HTLV-2 et notamment Vif, Rev, Nef et Tat des virus VIH-1 et VIH-2 ; on retient
5 particulièrement Rev, Nef et Tat, plus particulièrement Rev et Tat et de préférence ce dernier.

On peut aussi citer la protéine Tax de HTLV-1 ou HTLV-2.

On peut citer également tout particulièrement les régions extérieures aux régions basiques de Tat et de Rev c'est à dire extérieures aux
10 régions 49 à 57 de Tat et 35 à 50 de Rev, ou chevauchant ces régions sur au plus 4 acides aminés, de préférence au plus 2 acides aminés, particulièrement le peptide HQVSLSKQPTSQPRGD.

Par « dérivent » ou « dériver » d'une protéine de régulation d'un virus VIH1, VIH2, HTLV1 ou HTLV2, l'on entend que le composé immunogène
15 peut être constitué de la totalité ou d'un fragment de la protéine de régulation et peut comporter une ou plusieurs modifications dans les acides aminés de cette protéine ou fragment telles que des délétions, substitutions, additions, ou fonctionnalisations telles qu'acylation d'acides aminés, dans la mesure où ces modifications restent dans le cadre précisé ci-dessus (absence de toxicité,
20 caractères immunologiques). Par exemple, en général le remplacement d'un résidu leucine par un résidu isoleucine ne modifie pas de telles propriétés; les modifications doivent généralement concerner moins de 30% d'acides aminés, de préférence moins de 20% et tout particulièrement moins de 10% sur les segments d'homologie à la protéine de régulation d'au moins 8 acides aminés,
25 notamment au moins 12 acides aminés. Un fragment peut comporter de 8 à 60 acides aminés par exemple, de préférence de 12 à 40 acides aminés, et particulièrement de 25 à 40 acides aminés. On peut citer par exemple les résidus 65-80 en C terminal du Tat de VIH-1.

Dans des conditions préférentielles, les composés immunogènes
30 de l'invention comportent au moins 50% de la totalité de la protéine de régulation, de préférence au moins 70%, particulièrement au moins 90%, et

tout particulièrement la totalité ou quasi-totalité de ladite protéine.

De manière générale, en ce qui concerne les modifications, l'homologie ou la similitude entre l'immunogène modifié et la protéine ou partie de protéine native, ainsi que les dimensions du composé immunogène, de même que les modalités d'utilisation, ou de couplage du composé immunogène selon l'invention à une protéine immunogène telle que le toxoïde tétanique, on peut en particulier se référer à WO-A-86/06 414 ou à EP-A-0.220.273 ou encore à PCT/US.86/00831, équivalents, dont l'enseignement est incorporé ici par référence.

10 Les composés immunogènes selon l'invention peuvent être utilisés comme suit :

On administre à un patient un composé immunogène selon la présente invention, par exemple par voie sous-cutanée ou intramusculaire, en quantité suffisante pour être efficace sur le plan thérapeutique, à un sujet ayant besoin d'un tel traitement. La dose administrée peut aller par exemple de 100 à 1000 µg par voie sous-cutanée, une fois par mois pendant trois mois, puis périodiquement en fonction du taux des anticorps sériques induits, par exemple tous les 2-6 mois.

20 Une composition selon l'invention peut être administrée par n'importe quelle voie conventionnelle en usage dans le domaine des vaccins, en particulier par voie sous-cutanée, par voie intramusculaire, par voie intraveineuse ou par voie orale. L'administration peut avoir lieu en dose unique ou répétée une ou plusieurs fois après un certain intervalle de temps.

25 C'est pourquoi la présente demande a également pour objet une composition pharmaceutique, curative ou préventive, caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de principe actif, un composé immunogène tel que défini ci-dessus. Le composé immunogène peut être conditionné seul ou mélangé à un excipient pharmaceutiquement acceptable tel qu'un adjuvant.

30 L'invention a encore pour objet des médicaments caractérisés en ce qu'ils sont constitués des composés immunogènes tels que définis ci-dessus, à savoir des composés immunogènes ci-dessus pour leur utilisation

dans une méthode de traitement thérapeutique du corps humain ou animal, ainsi que l'utilisation d'un tel composé immunogène pour la préparation d'un médicament curatif ou préventif destiné au traitement ou à la prévention des effets nocifs des protéines de régulation ci-dessus, et notamment du Tat. En effet, les composés selon l'invention ont perdu leurs propriétés toxiques et peuvent donc être administrés chez l'homme comme on le verra ci-après dans la partie expérimentale.

L'administration de composés immunogènes selon l'invention correspond à une immunothérapie active. Il peut être intéressant également de procéder à une immunothérapie passive, c'est à dire de fournir à un patient directement des anticorps dont il a besoin pour neutraliser les effets nocifs des protéines de régulation des virus VIH-1, VIH-2, HTLV-1 ou HTLV-2.

Ces anticorps anti-protéine de régulation peuvent être obtenus classiquement et à titre d'exemple après immunisation d'un mammifère, homme ou animal, à l'aide d'un composé immunogène tel que défini ci-dessus, par clonage de lymphocytes B humains transformés par le virus Epstein-Barr puis récupération des anticorps attendus sécrétés par lesdits lymphocytes B transformés, ou encore par recombinaison génétique à partir d'une librairie de phages.

C'est pourquoi la présente demande a également pour objet de tels procédés de préparation d'anticorps anti-protéine de régulation d'un virus VIH-1, VIH-2, HTLV-1 ou HTLV-2 et en particulier d'anticorps anti-Tat toxoïde, et notamment un procédé de préparation d'un anticorps ci-dessus caractérisé en ce que l'on immunise un mammifère à l'aide d'un composé immunogène tel que défini ci-dessus.

La présente demande a encore pour objet un anticorps anti-protéine de régulation d'un virus VIH-1, VIH-2, HTLV-1 ou HTLV-2 et en particulier des anticorps polyclonaux ou monoclonaux obtenus à partir de sujets humains ou de mammifères immunisés par la mise en oeuvre des procédés ci-dessus décrits.

Ces anticorps spécifiques pourront provenir :

1. soit du sujet lui-même, induits par une immunisation active (vaccination) avec une protéine de régulation biologiquement inactivée mais immunogène, notamment le Tat. Un tel composé immunogène, dans le cas par exemple du Tat est appelé Tat-toxoïde par analogie aux toxoïdes bactériens,

- 5 2. soit d'un organisme étranger, allo- ou xénogénique, administré au sujet par immunisation passive (sérothérapie). Les anticorps allogéniques (chez l'homme) pourront être engendrés chez des sujets non infectés volontaires après immunisation active (vaccination) avec une protéine immunogène ou ses dérivés selon l'invention, notamment du Tat (Tat-toxoïde
- 10 ou fragments peptidiques du Tat selon l'invention). Ces anticorps administrés passivement, qu'ils soient allogéniques (humains) ou xénogéniques (animaux), pourront être des anticorps monoclonaux ou polyclonaux complets ou des fragments F(ab')₂ ou Fab de l'anticorps.

Par « anticorps anti-protéine de régulation », l'on entend des

15 anticorps monoclonaux ou polyclonaux ou des fragments F(ab')₂ ou Fab de ces anticorps ou encore des anticorps anti-protéine de régulation obtenus par construction génétique à partir d'une librairie de phages.

Les anticorps allogéniques d'origine humaine sont :

- soit polyclonaux - pouvant être obtenus chez des sujets
- 20 séronégatifs volontaires immunisés avec un composé immunogène selon l'invention, notamment du Tat-toxoïde ou des fragments peptidiques de Tat.

- soit monoclonaux à partir de clones spécifiques de cellules B transformées par le virus EBV de ces individus immunisés (lignées B EBV spécifiques).

25 Les anticorps xénogéniques proviennent d'animaux hyperimmunisés avec un composé immunogène selon l'invention, notamment du Tat ou ses dérivés (Tat-toxoïde, fragments peptidiques de Tat détoxifiés selon l'invention), et sont

- soit polyclonaux provenant d'animaux hyperimmunisés,
- 30 - soit monoclonaux, obtenus après hybridation selon la technique que Kohler et Milstein de cellules spléniques ou d'adénocytes avec une lignée

myélomateuse, type x63, notamment x63AG3. Dans ce cas on préfère les anticorps équins ou de lapin.

La présente demande a encore pour objet un procédé de préparation d'anticorps anti-protéine de régulation d'un virus VIH-1, VIH-2,
5 HTLV-1 ou HTLV-2, caractérisé en ce que l'on immunise un mammifère, homme ou animal, avec un composé immunogène tel que défini ci-dessus.

La présente invention a aussi pour objet un procédé de préparation d'anticorps monoclonaux anti-protéine de régulation d'un virus VIH-1, VIH-2, HTLV-1 ou HTLV-2, caractérisé en ce que l'on utilise des cellules B
10 provenant d'individus immunisés par un composé immunogène selon la présente invention, lesdites cellules B étant transformées par le virus EBV et produisant des anticorps spécifiques anti-protéine de régulation d'un virus VIH-1, VIH-2, HTLV-1 ou HTLV-2.

Les cellules EBV + ci-dessus peuvent être cultivées de manière à
15 produire les anticorps attendus. Ces cellules, comme on l'a vu, proviennent notamment de malades immunisés par une protéine de régulation native, ou par un composé immunogène selon l'invention.

La présente demande a encore pour objet un procédé de préparation d'anticorps selon l'invention monoclonaux, dirigés contre une
20 protéine de régulation d'un virus VIH-1, VIH-2, HTLV-1 ou HTLV-2 inactivée ou non, caractérisé en ce que l'on prépare des hybridomes de mammifère, notamment de souris à partir de splénocytes ou adénocytes notamment de souris immunisées par une protéine de régulation native ou un composé immunogène selon l'invention, et de cellules de myélome, de préférence de
25 lignée x63, selon les procédés bien connus de l'état de la technique (Kohler et Milstein).

La présente demande a également pour objet un procédé d'obtention d'anticorps anti-protéine de régulation d'un virus VIH-1, VIH-2, HTLV-1 ou HTLV-2, par la technologie de recombinaison génétique, caractérisé
30 en ce que l'on utilise à titre d'immunogène un composé immunogène tel que défini ci-dessus.

La présente demande a encore pour objet des fragments F(ab')₂ ou Fab desdits anticorps ; ceux-ci peuvent être obtenus par digestion enzymatique par exemple.

La présente invention a tout autant pour objet un procédé
5 d'immunisation passive de sujets contaminés par le virus VIH, utilisant des anticorps spécifiques anti protéine de régulation de la multiplication du virus VIH et spécialement anti-Tat neutralisant ou bloquant les effets nocifs de cette protéine dans sa configuration extracellulaire et préparés comme indiqué ci-dessus, ou des fragments F(ab')₂ ou F(ab) de ces anticorps.

10 La présente demande a aussi pour objet un procédé d'immunisation active anti-VIH ou Sida utilisant un composé immunogène décrit ci-dessus, associé à une protéine constitutive (ou de structure) d'un virus VIH, notamment la glycoprotéine d'enveloppe gp 120 ou gp 160 ou un fragment peptidique modifié ou non de celles-ci, ou au virus VIH inactivé, ou au virus VIH
15 déplété de son ARN génomique par exemple par hydrolyse alcaline.

L'invention a encore pour objet un procédé d'immunisation active anti-VIH ou - Sida utilisant un composé immunogène décrit ci-dessus, associé à un ou plusieurs immunogènes à base de cytokines inactivées et spécialement l'interféron α , le TGF β ou le TNF. En effet, comme on le verra ci-
20 après dans la partie expérimentale, une combinaison des effets des anticorps selon l'invention contre des protéines de régulation et des anticorps anti-interféron α en particulier, restaure complètement l'immunosuppression induite par le VIH.

C'est pourquoi la présente demande a encore pour objet une
25 composition renfermant deux composés immunogènes, à savoir un composé immunogène ci-dessus décrit, et un composé immunogène capable d'induire des anticorps contre une cytokine, comme l'interféron α ou le TNF α , comme décrit par exemple dans WO-A-9118454, ainsi qu'une composition refermant un anticorps dirigé contre une cytokine notamment l'interféron α et un anticorps
30 ci-dessus dirigé contre une protéine de régulation.

La présente demande a également pour objet un procédé d'immunisation active caractérisé en ce que l'on utilise à titre d'immunogène un composé immunogène tel que défini ci-dessus associé à un adjuvant d'immunité minéral, huileux ou de synthèse, ou encore un composé
5 immunogène tel que défini ci-dessus couplé ou associé à une protéine augmentant son immunogénicité.

Ces immunisations peuvent être réalisées tant à titre curatif qu'à titre préventif.

A titre d'immunogène pour tous les procédés ci-dessus et ci-
10 après, on utilise de préférence un dérivé de la protéine Tat.

La présente invention a encore pour objet un procédé d'hyperimmunisation de sujets séronégatifs ou séropositifs VIH-1, VIH-2, HTLV-1 ou HTLV-2, caractérisé en ce que l'on utilise un immunogène tel que défini ci-dessus, pour la production de sérums humains hyperimmuns, lesquels peuvent
15 être particulièrement destinés à la sérothérapie passive par administration d'anticorps spécifiques purifiés ou de leurs fragments F(ab')₂ ou Fab.

L'invention a en outre pour objet une composition pharmaceutique comprenant, à titre de principe actif curatif ou préventif, au moins un anticorps anti-protéine de régulation d'un virus tel que défini ci-dessus ou obtenu selon
20 les procédés ci-dessus.

L'invention a enfin pour objet l'utilisation d'un composé immunogène ou d'un anticorps ci-dessus pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des effets nocifs d'une protéine de régulation d'un virus VIH-1, VIH-2, HTLV-1 ou HTLV-2.

25 En résumé et notamment, la présente invention a pour objet l'usage à titre préventif, ou curatif chez le sujet séropositif ou atteint d'ARC/Sida d'anticorps spécifiques de manière à bloquer l'action nocive d'une protéine de régulation d'un virus VIH-1, VIH-2, HTLV-1 ou HTLV-2 et notamment du Tat circulant. Ces anticorps spécifiques pourront provenir: 1. du sujet lui-même,
30 induits par une immunisation active (vaccination) avec du Tat biologiquement inactivé mais immunogène, appelé Tat-toxoïde par analogie aux toxoïdes

bactériens ou 2. d'un organisme étranger, allo- ou xénogénique, administré au sujet par immunisation passive (sérothérapie). Les anticorps allogéniques (chez l'homme) pourront être engendrés chez des sujets non infectés volontaires après immunisation active (vaccination) avec une protéine de régulation telle
5 que le Tat ou ses dérivés (Tat-toxoïde ou fragments peptidiques du Tat selon l'invention). Ces anticorps administrés passivement, qu'ils soient allogéniques (humains) ou xénogéniques (animaux), pourront être des anticorps monoclonaux ou polyclonaux complets ou des fragments F(ab')₂ ou Fab de l'anticorps.

10 Par Tat-toxoïde, comme on l'a indiqué ci-dessus on entend un peptide ou une protéine Tat traitée par un agent chimique. Ce traitement a fait perdre à la molécule les propriétés biologiques toxiques du Tat circulant (immunosuppression des cellules T; induction de la production d'interféron α par les cellules productrices d'interféron ; néoangiogenèse des cellules
15 endothéliales; blocage de l'effet antiviral de l'interféron sur les macrophages) mais ont préservé les propriétés susceptibles d'induire la formation des anticorps, lorsque présentée et préparée de manière appropriée, couplée ou non à un "carrier", agrégée ou non, en présence ou non d'adjuvant.

On a élargi la notion de Tat-toxoïde aux fragments peptidiques
20 immunogènes de Tat c'est-à-dire une séquence peptidique du Tat susceptible d'induire la formation des anticorps anti-Tat lorsqu'elle est présentée de manière appropriée, couplée à un carrier ou non, en présence ou non d'adjuvant.

L'invention a également pour objet des compositions
25 pharmaceutiques.

a) Une composition pharmaceutique comprenant à titre d'agent préventif ou curatif un toxoïde viral ou un fragment ou analogue de protéine de régulation, notamment du Tat selon l'invention.

b) Une composition pharmaceutique comprenant à titre d'agent
30 préventif ou curatif des anticorps anti-Tat produits à partir d'organismes immunisés contre ladite protéine ou ses fragments F(ab')₂ ou Fab, selon

l'invention.

En outre l'invention propose également un kit comprenant une composition pharmaceutique vaccinale qui en plus du principe actif (Tat-toxoïde ou ses dérivés ou anticorps anti-Tat) peut comprendre un adjuvant et/ou un
5 autre immunogène à propriétés anti-rétrovirus.

Enfin l'invention propose une composition pharmaceutique sous une forme galénique conventionnelle. En particulier on associe le principe actif selon l'invention en quantité suffisante pour être efficace d'un point de vue thérapeutique avec un diluant ou un support acceptable d'un point de vue
10 pharmaceutique.

EXPERIENCE 1 : Effets pathogènes de la protéine Tat circulante

Immunosuppression des cellules T en présence de Tat:

L'effet du Tat sur des lymphocytes T activés du sang périphérique
15 a été recherché. Des cellules mononuclées (PMBC) et des lymphocytes T (HLA 35 DR-) isolés par immunomagnétisme ont été activés par des anticorps anti-CD3 en présence ou en absence de la molécule Tat. Après 5 jours de culture, la prolifération cellulaire a été mesurée par incorporation de thymidine H₃. Les résultats ont montré que le Tat inhibait la prolifération des cellules T HLA DR-
20 (85% d'inhibition à la concentration de 1,5 µg par ml). Cette inhibition disparaît en présence d'anticorps spécifique anti-Tat (Intracel, U.K.).

EXPERIENCE 2 : Effets pathogènes de la protéine Tat circulante :

Inhibition de l'effet de l'interféron sur les macrophages en
25 présence de Tat :

L'effet du Tat sur l'action antivirale de l'interféron α a été mesuré par le test biologique conventionnel en utilisant la mesure du pouvoir cytopathogène du virus VSV sur les cellules MDBK.

Effet du Tat sur l'interféron exogène

30 Des doses croissantes de Tat ont permis d'inhiber dès de faibles concentrations suivant une courbe dose-effet pour des concentrations de Tat

allant de 1 à 20 µg/ml, le pouvoir anti-viral de l'interféron exogène. Dans une expérience représentative, l'effet protecteur de l'interféron α apparent jusqu'à la dilution 1/4800 (correspondant à 150 U.I.) est réduit à la dilution 1/300 pour des concentrations de Tat de 10 µg/ml. Ainsi à la concentration de 10 µg/ml de Tat, à la dilution 4 800 de l'interféron exogène le titre de VSV est passé de $10^{3,8}$ (échantillons interféron sans Tat) à $10^{5,5}$ (échantillons interféron en présence de Tat). Dans ces expériences, l'inhibition de l'effet anti-viral de l'interféron α par la molécule Tat est supprimée en présence d'anticorps spécifiques anti-Tat (Intracel, U.K.), de même que par les anticorps de cheval que nous avons préparé (voir exemples ci-après).

EXPERIENCE 3 : Mise en évidence chez les sujets infectés par le VIH-1 de la protéine Tat dans sa configuration extracellulaire.

Présence d'anticorps anti-Tat dans le sérum de patients séropositifs:

a) Une étude par Elisa des anticorps anti-Tat sériques utilisant comme antigène la molécule Tat native a été réalisée chez 50 sujets séropositifs et 15 sujets séronégatifs. Tous les sérums des sujets séronégatifs et 20 sérums de séropositifs n'ont pas révélé la présence d'anticorps anti-Tat avec une densité optique inférieure au seuil (cut off) (D.O. = 0,250). Parmi les 30 sérums de sujets infectés par le VIH, qui ont dépassé le seuil, 6 ont une DO supérieure à 0,500. Aucune corrélation apparente n'a pu être faite entre la présence d'anticorps anti-Tat d'une part, l'état clinique et le nombre de cellules CD4 par mm^3 de sang d'autre part.

b) Une étude par Elisa d'anticorps anti-Tat sériques utilisant comme antigènes différents peptides du Tat a été réalisée chez des sujets séropositifs à différents stades de l'évolution de leur infection VIH - sujets asymptomatiques ; patients présentant des manifestations cliniques pré-Sida (ARC) et patients atteints de Sida. Les résultats de cette étude sont les suivants:

1) Les séquences peptidiques du Tat

MEPVDPRLPWKHPG (résidus 1 - 15 en N terminal)

HQVSLSKQPTSQPRGD (résidus 65 - 80 en C terminal)

ont été reconnues par la grande majorité des sérums de séropositifs et par
5 aucun sérum de séronégatifs (contrôles). Les réactions ont été fortement
positives mais aucune corrélation n'a pu être montrée en rapport avec
l'évolution de l'infection VIH et le nombre de CD4 des sujets.

2) Les autres séquences étudiées n'ont pas été reconnues de
manière notable par les sérums qu'ils soient d'individus séropositifs ou
10 contrôles (voir Tableau 1). Seuls quelques rares sérums pour chaque séquence
ont montré une densité optique supérieure au seuil (2 fois la moyenne des
sérums contrôles).

TABLEAU 1

Résidus peptidiques du Tat	Sujets infectés* (72 sérums)		Sujets contrôles (10 sérums)	
	Sérums positifs**	D.O. moyenne	Sérums positifs**	D. O. moyenne
1 - 15	67	0,43	0	0,08
9 - 20	0	0,26	0	
22 - 37	7	0,78	0	0,41
36 - 50	5	0,86	0	0,65
46 - 60	6	0,53	0	0,40
52 - 60	2	0,32	0	0,38
56 - 70	0	0,19	0	0,20
65 - 80	70	1,01	0	0,08

* Les sujets infectés par le VIH sont à des stades variés; sujets
asymptomatiques, patients atteints d'ARC et patients atteints de Sida.

** La réaction est considérée positive (seuil) lorsque la densité optique est 2
fois supérieure à la moyenne des séronégatifs.

20 3) Il est intéressant de noter que la séquence la plus réactive
(AA 65 - 80) est celle contenant les résidus RGD reconnus par les intégrines.

EXEMPLE 1 : Préparation de la protéine Tat immunogène (Tat-toxoïde).

Inactivation de la protéine Tat en présence de formaldéhyde

A une solution de Tat (1 mg/ml) dans du phosphate disodique 70 mM, pH 8,0, on ajoute du formaldéhyde à la concentration finale 33 mM.

Le mélange est incubé à 37 °C pendant 1,3,5,7 et 9 jours. A la fin
5 de chacune des périodes d'incubation, un échantillon est prélevé et la réaction avec le formaldéhyde bloquée par addition de glycine à la concentration finale 100 mM.

Chaque prélèvement est dialysé pendant 1 nuit à 4°C contre 100 fois son volume de PBS (tampon phosphate salin).

10

EXEMPLE 2 : Préparation de la protéine Tat immunogène (Tat-toxoïde)

Inactivation de la protéine Tat en présence de glutaraldéhyde

A une solution de Tat (1 mg/ml) dans du phosphate disodique 70 mM, pH 8,2 on ajoute du glutaraldéhyde à la concentration finale, soit 0,026
15 M, soit 0,0026 M. On laisse la réaction avec le glutaraldéhyde se poursuivre pendant des temps divers variant de 1 mn à 3 h. Après le temps de réaction choisi, à la température du laboratoire, la réaction est bloquée par addition de glycine à la concentration finale de 100 mM. Les différents prélèvements sont dialysés, pendant 16 heures, à 4°C, contre 100 fois leur volume de PBS.

20

EXEMPLE 3 : Préparation de la protéine Tat immunogène (Tat-toxoïde)

Inactivation et couplage simultané à la toxine tétanique du Tat

A un mélange de toxine tétanique et de Tat dans un rapport molaire de 1 à 15, dans un tampon phosphate 70 mM - 100 mM (pH variant de
25 6,8 à 8,2) on a ajouté du glutaraldéhyde à la concentration finale (variant de 0,0026 M à 0,026 M) et on laisse la réaction d'inactivation et de couplage s'effectuer pendant des temps variables (3-15 mn) à la température du laboratoire. La réaction est bloquée par addition de glycine à la concentration finale 100 mM et les différents prélèvements sont dialysés pendant 16 heures,
30 à 4°C, contre 100 fois leur volume de PBS.

EXEMPLE 4 : Pouvoir immunogène et antigénicité des Tat-toxoïdes

Tat-toxoïde immunogène chez la souris: Anticorps par Elisa

Le pouvoir immunogène des différentes préparations de Tat inactivé, soit par le formaldéhyde (Tat-toxoïde), soit par le glutaraldéhyde (Tat-polan), soit après couplage à la toxine tétanique (conjugué Tat-toxine tétanique), c'est à dire des composés immunogènes des exemples 1 à 3, a été déterminé chez la souris.

Des souris Swiss de 18-20g ont été immunisées par 2 injections sous-cutanées de l'immunogène des exemples 1, 2 et 3 en présence d'adjuvant complet de Freund, la seconde pratiquée 3 semaines après la 1 ère avec 20 µg de préparation en émulsion en présence d'adjuvant incomplet de Freund.

15 jours après l'injection de rappel, des prélèvements sanguins ont été pratiqués par voie intracardiaque. Les anticorps anti-Tat ont été déterminés dans les sérums par Elisa. La densité optique a été mesurée à 490 nm.

Les résultats obtenus, résumés dans le Tableau 2, montrent que toutes les préparations de Tat sont immunogènes à des degrés divers, hormis le conjugué Tat-TT traité pendant un temps court (3 minutes) par la glutaraldéhyde, qui s'est avéré toxique et a tué les souris en 24 heures (TT trop faiblement inactivé). Il est à signaler que les sérums des souris non-immunisées répondent en dessous de 0,200 (D.O) au Tat natif comme au Tat-toxoïde. De plus ces résultats montrent que le Tat natif est reconnu par les anticorps de la même façon que le toxoïde, ce qui confirme leur antigénicité équivalente et justifie encore l'utilisation du Tat-toxoïde pour immuniser.

TABLEAU 2

Préparations	Taux d'anticorps anti-Tat natif Densité Optique (D.O)	Taux d'anticorps anti-Tat toxoïde (3 jours) Densité Optique (D.O)
Tat-toxoïde (1 jours)	0,320	0,331
Tat-toxoïde (3 jours)	0,465	0,494
Tat-toxoïde (5 jours)	0,998	0,901
Tat-toxoïde (9 jours)	0,807	0,780
Tat -polan (1 mn;) 0,026 M	0,718	0,706
Tat -polan (15 mn;) 0,026 M	1,564	1,452
Tat -polan (60 mn;) 0,0026 M	1,065	1,113
Tat -polan (3h;) 0,0026 M	0,194	0,210
conjugué Tat - TT (3 mn; 0,0026M)	toxique	toxique
conjugué Tat - TT (15 mn; 0,0026M)	1,987	1,897
conjugué Tat - TT (6 mn; 0,026M)	0,824	0,795
conjugué Tat - TT (15 mn; 0,026M)	1,642	1,556

5 EXEMPLE 5 : Toxicité aiguë

La toxicité des préparations de Tat-toxoïde et de Tat-polan a été déterminée par injection sous-cutanée à la souris Swiss de 18-20g. Les préparations de Tat-toxoïde (7 jours) et Tat-polan (15 mn; 0,026 M) ont été administrées à la dose de 100 µg par souris. Les animaux ont été observés pendant 7 jours.

Aucun signe manifeste de toxicité n'a été observé. Le poids des animaux a continué de croître. L'examen macroscopique des organes à l'autopsie n'a pas permis de révéler d'anomalies.

15 EXEMPLE 6 : Anticorps anti-Tat

On a préparé des anticorps anti-Tat comme suit : on a isolé la fraction IgG sur une colonne de protéine G à partir de sérums de souris immunisées avec du Tat-polan. Les fragments F(ab')₂ ont été également préparés à partir de la fraction IgG isolée par digestion pepsique. La réactivité immunologique de ces fractions a été vérifiée par Elisa.

EXEMPLE 7 : Inactivité biologique du Tat-toxoïde

Les différents Tat-toxoïdes inactivés 1, 3, 5 , et 9 jours de l'exemple 1 sont testés dans un test d'activité d'expression du gène reporter Chloramphénicol-Acétyl-Transférase (CAT) dépendants du "Long Terminal Repeat" (LTR) du VIH-1.

Le principe de cet essai est le suivant : des cellules de lignée Hela contenant le gène CAT sous contrôle du LTR du VIH, sont mises en contact avec le Tat natif ou les toxoïdes pendant 6h. Après 24h de culture, les cellules sont lysées et la quantité de CAT produite est mesurée par un test d'activité du CAT qui mesure le pourcentage d'acétyl-CoA accroché au chloramphénicol. Si la molécule Tat est active, il y aura un fort pourcentage de chloramphénicol acétylé, sinon ce pourcentage sera faible. La culture de ces cellules adhérentes se fait de manière standard en milieu RPMI, 10% FCS. La concentration de Tat ajoutée pour avoir un effet-dose va de 1 µg à 10 µg par ml de surnageant.

Les résultats présentés ici montrent que le Tat-toxoïde est totalement inactivé après 3 jours, avec une activité résiduelle faible à 1 jour.

Préparations	Acétylation du chloramphénicol (%)
Tat natif	100
Tat-toxoïde (1 jours)	18
Tat-toxoïde (3 jours)	3
Tat-toxoïde (5 jours)	2
Tat-toxoïde (9 jours)	3

EXEMPLE 8 : Absence d'effets pathogènes du Tat-toxoïde

a) Absence d'immunosuppression des cellules T en présence de Tat-toxoïde (contrairement aux expériences 1 et 2).

L'effet du Tat-toxoïde (5 jours) sur des lymphocytes T activés du sang périphérique a été recherché. Des cellules mononuclées (PMBC) et des lymphocytes T (HLA 35 DR-) isolés par immunomagnétisme ont été activés par des anticorps anti-CD3 en présence ou en absence de composés

immunogènes de l'exemple 1. Après 5 jours de culture, la prolifération cellulaire a été mesurée par incorporation de thymidine H₃. Les résultats ont montré que, contrairement au Tat natif, le Tat-toxoïde n'inhibait pas la prolifération des cellules T HLA DR-. Ainsi, à la dose de 5 µg/ml dans la culture, en présence de
5 Tat-toxoïde, la prolifération des cellules était identique à celle du contrôle.

b) Absence d'inhibition de l'effet de l'interféron α sur les macrophages en présence de Tat-toxoïde:

L'effet du Tat-toxoïde sur l'action antivirale de l'interféron α a été mesuré par le test biologique conventionnel en utilisant la mesure du pouvoir
10 cytopathogène du virus VSV sur les cellules MDBK.

Effet du Tat-toxoïde sur l'interféron exogène

Contrairement au Tat natif, des doses équivalentes de Tat-toxoïde de l'exemple 1 n'ont pas permis d'inhiber le pouvoir anti-viral de l'interféron exogène. Dans une expérience représentative, l'effet protecteur de
15 l'interféron α apparent jusqu'à la dilution 1/4800 (correspondant à 150 U.I.) est maintenu en présence de 50 µg de Tat-toxoïde, alors qu'il est diminué au 1/300 avec le Tat natif. A la dilution 4 800 de l'interféron exogène le titre de VSV est maintenu au niveau du contrôle à $10^{3,8}$ (échantillons interféron avec Tat-toxoïde) alors qu'il passe à $10^{5,5}$ (échantillons interféron en présence de Tat).

20

EXEMPLE 9 : Rôle protecteur des anticorps anti-Tat-toxoïde face aux effets du Tat natif.

Des anticorps anti-Tat-toxoïdes de l'expérience 1 (traitement au formaldéhyde 3 jours) ont été préparés chez des chevaux hyperimmunisés. A
25 partir de ces anticorps des fragments F(ab')₂ ont été aussi préparés selon la procédure décrite dans l'exemple 6.

Les anticorps, comme les fragments F(ab')₂, inhibent les différentes activités biologiques du Tat natif dans les différents tests: transactivation du LTR du VIH (essai CAT) (voir exemple 7),
30 immunosuppression (voir expérience 1), inhibition de l'effet de l'interféron α

exogène sur culture (voir expérience 2). Les expériences 1, 2, et l'exemple 7 ont été repris avec du Tat natif et en préincubant ou non ce Tat natif 1h à 37° avec les anticorps ou fragments F(ab')₂, à la dose de 40 µg d'anticorps pour 1 µg de Tat natif. Les résultats ont montré que les anticorps inhibent l'action du

5 Tat natif.

EXEMPLE 10 : Redressement systématique de la prolifération cellulaire grâce à la combinaison anticorps anti-Tat et anticorps anti-interféron α : synergie des anticorps anti-Tat et anti-interféron α .

10

On a observé que des PBLs (cellules mononucléées du sang périphérique) de sujets sains infectées in vitro avec du VIH-1 et cultivées 6 jours exerçaient une activité immunosuppressive.

En effet, si l'on ajoute de telles cellules infectées depuis 6 jours,

15 ou non infectées) irradiées en proportion de 1 pour 5 à des cellules autologues activées par la protéine Staphylococcus Enterotoxin B (SEB), on observe au bout de 4 jours que la prolifération des cellules autologues est amoindrie de 80% par rapport aux contrôles (cellules non infectées).

Dans ce modèle, si on ajoute à la culture des cellules infectées in

20 vitro des anticorps anti-interféron α , ces cellules perdent alors leur effet supprimeur dans 50% des sujets. Chez 20% des cas, les cellules suppressives perdent 60% de leur effet supprimeur, et chez 30% cet effet supprimeur est significativement maintenu.

Si on ajoute aux anticorps anti-interféron α des anticorps anti-Tat

25 (monoclonaux décrits en expérience 1, ou polyclonaux de cheval de l'exemple 9), c'est dans 100% des cas que les cellules infectées in vitro perdent leur effet supprimeur.

Ces expériences montrent le rôle combiné toxique de Tat et de l'interféron α dans l'immunosuppression induite par le VIH1 et qu'une

30 association d'anticorps anti-interféron et anti-Tat restaure une immunité normale.

EXEMPLE 11 : Immunisation de patients infectés par le VIH-1

6 patients volontaires avec un taux de lymphocytes CD4 allant de 250 à 500 ont été immunisés par du Tat-polan préparé selon l'exemple 2 (15 mn). Pour cela ils ont reçu 3 injections initiales intramusculaires de Tat-toxoïde (400 µg / injection) à un mois d'intervalle et un rappel à 6 mois. L'adjuvant utilisé pour ces injections a été le phosphate de calcium. Le tableau présente la réponse observée chez ces individus avant les immunisations et après (7 mois après la première injection).

10

PATIENT	ELISA anti-Tat Densité Optique (D.O)		Taux de lymphocytes CD4 (cellules/mm ³)	
	Avant	Après	Avant	Après
1	0,220	1,123	283	314
2	0,356	0,984	367	340
3	0,255	0,650	436	619
4	0,750	0,912	409	430
5	0,195	0,785	428	386
6	0,395	0,659	471	527

Ces résultats montrent que la réponse anticorps dirigée contre le Tat natif est très significativement augmentée grâce à l'immunisation à l'aide du Tat-toxoïde de l'exemple 1 et que le taux de lymphocytes CD4 est resté stable sur cette durée.

Cet essai de phase 1 montre la non-toxicité de l'immunisation avec le Tat-toxoïde et confirme son immunogénicité. Notamment, les constantes biologiques des patients sont restées stables, notamment le phénotype CD4.

20 **EXEMPLE 12 : Préparation de la protéine Nef immunogène (Nef-toxoïde)**

Inactivation de la protéine Nef en présence de formaldéhyde.

A une solution de protéine Nef (1g/ml) dans du phosphate disodique 70mM, pH 8,0, on ajoute du formaldéhyde à la concentration finale de 33 mM.

Le mélange est incubé à 37°C pendant 1, 3, 5, 7 et 9 jours. A la fin de chacune des périodes d'incubation, un échantillon est prélevé et la réaction avec le formaldéhyde bloquée par addition de glycine à la concentration finale 100mM.

- 5 Chaque prélèvement est dialysé pendant 1 nuit à 4°C contre 100 fois son volume de PBS (tampon phosphate salin), et le Nef-toxoïde isolé.

EXEMPLE 13 : Préparation de la protéine Nef immunogène (Nef-polan)

Inactivation de la protéine Nef en présence de glutaraldéhyde.

- 10 A une solution de Nef (1mg/mlm) dans du phosphate disodique 70mM, pH 8,2, on ajoute du glutaraldéhyde à la concentration finale, soit 0,026 M, soit 0,0026 M. On laisse la réaction avec le glutaraldéhyde se poursuivre pendant des temps divers variant de 1mn jusqu'à 3 H. Après le temps de réaction choisi, à la température du laboratoire, la réaction est
- 15 bloquée par addition de glycine à la concentration finale de 100 mM. les différents prélèvements sont dialysés, pendant 16 heures, à 4°C, contre 100 fois leur volume de PBS, et le Nef-polan isolé.

EXEMPLE 14 : Pouvoir immunogène et antigénicité des Nef-toxoïdes

- 20 Nef-toxoïde immunogène chez la souris : Anticorps par Elisa.

Le pouvoir immunogène des différentes préparations de Nef inactivé, soit par le formaldéhyde (Nef-toxoïde), soit par le glutaraldéhyde (Nef-polan), c'est à dire les composés immunogènes des exemples 12 et 13, a été déterminé chez la souris.

- 25 Des souris Swiss de 18-20 g on été immunisées par 2 injections sous-cutanées de l'immunogène des exemples 12 et 13 en présence d'adjuvant de Freund, la seconde pratiquée 3 semaines après la première, avec 20 µg de préparation en émulsion en présence d'adjuvant incomplet de Freund.

- 30 15 jours après l'injection de rappel, les prélèvements sanguins ont été pratiqués par voie intracardiaque. Les anticorps anti-Nef ont été déterminés

dans les sérums par Elisa. La densité optique a été mesurée à 490 nm.

Les résultats obtenus, résumés dans le tableau ci-après, montrent que toutes les préparations de Nef sont immunogènes à des divers degrés. Il faut signaler que les sérums de souris non immunisées donnent un niveau de

5 réponse inférieur à 0,2 (en D.O) dans ces essais Elisa.

Ces résultats montrent que la protéine Nef native est reconnue par les anticorps de la même façon que le toxoïde, ce qui confirme leur antigénicité équivalente et justifie encore l'utilisation du Nef-toxoïde pour immuniser.

10

Préparations	Taux d'anticorps anti-Nef natif Densité Optique (D.O)	Taux d'anticorps anti-Nef toxoïde (3 jours) Densité Optique (D.O)
Nef-toxoïde (1 jours)	0,56	0,5
Nef-toxoïde (3 jours)	0,78	0,8
Nef-toxoïde (5 jours)	0,99	1,01
Nef-toxoïde (9 jours)	0,65	0,75
Nef -polan (1 mn;) 0,026 M	1,12	0,98
Nef -polan (15 mn;) 0,026 M	1,69	1,56
Nef -polan (60 mn;) 0,0026 M	1,31	1,41
Nef -polan (3h;) 0,0026 M	0,35	0,41

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE :

(i) DEPOSANT :

- (A) NOM : NEOVACS
- (B) RUE : 117, rue Vieille du Temple
- (C) VILLE : PARIS
- (E) PAYS : FRANCE
- (F) CODE POSTAL : 75003

(ii) TITRE DE L'INVENTION : Nouveaux immunogènes, de nouveaux anticorps, leur procédé de préparation et des compositions pharmaceutiques les renfermant.

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES : 1

(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR :

- (A) TYPE DE SUPPORT : Floppy disk
- (B) ORDINATEUR : IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D'EXPLOITATION : PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL : PatentIn Release # 1.0, Version # 1.25

(OEB)

(2) INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID NO : 1 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 16 acides aminés
- (B) TYPE : acide aminé
- (C) NOMBRE DE BRINS : simple
- (D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID NO : 1 :

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Thr Ser Gln Pro Arg Gly Asp
1 5 10 15

REVENDICATIONS

1. Composé immunogène administrable à l'homme car dénué de toxicité, caractérisé en ce qu'il dérive d'une protéine de régulation d'un virus VIH-1, VIH-2, HTLV-1 ou HTLV-2, par traitement chimique à l'aide d'un agent
5 de couplage tel qu'un aldéhyde, ou d'une protéine porteuse activée par un pré-traitement à l'aide d'un aldéhyde, lui permettant d'être reconnu par des anticorps dirigés contre ladite de protéine de régulation, et de conserver des propriétés immunogènes suffisantes pour créer des anticorps neutralisant ou bloquant ladite protéine native, tout en ayant perdu au moins 50%, des
10 propriétés biologiques toxiques de ladite protéine native.
2. Composé immunogène selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il dérive d'une des protéines de régulation suivantes des virus VIH-1 ou VIH-2, Nef, Tat, Vif ou Rev.
3. Composé immunogène selon la revendication 2, caractérisé en
15 ce qu'il dérive de la protéine Tat.
4. Composé immunogène selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il dérive d'une protéine Tax, d'un virus HTLV-1 ou HTLV-2.
5. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend un composé immunogène tel que défini à l'une des revendications 1
20 à 4.
6. Un composé immunogène tel que défini à l'une des revendications 1 à 4 pour son utilisation dans une méthode de traitement du corps humain ou animal.
7. Procédé de préparation d'un composé immunogène tel que
25 défini à l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce que l'on soumet une protéine de régulation d'un virus VIH-1, VIH-2, HTLV-1 ou HTLV-2 à un traitement chimique à l'aide d'un aldéhyde, sélectionne puis purifie le composé attendu.
8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que le
30 traitement chimique comprend un traitement à l'aide d'un aldéhyde suivi d'un

couplage à une protéine porteuse.

9. Procédé de préparation d'un anticorps anti-protéine de régulation d'un virus VIH-1, VIH-2, HTLV-1 ou HTLV-2 caractérisé en ce que l'on immunise un mammifère à l'aide d'un composé immunogène tel que défini
5 à l'une des revendications 1 à 4.

10. Procédé de préparation d'un anticorps anti-protéine de régulation d'un virus VIH-1, VIH-2, HTLV-1 ou HTLV-2 caractérisé en ce que l'on procède au clonage de lymphocytes B transformés par le virus Epstein-Barr, puis récupère les anticorps attendus sécrétés par lesdits lymphocytes B
10 transformés.

11. Procédé de préparation d'un anticorps anti-protéine Tat d'un virus VIH-1 ou VIH-2, caractérisé en ce que l'on procède au clonage de lymphocytes B transformés par le virus Epstein-Barr, puis récupère les anticorps attendus sécrétés par lesdits lymphocytes B transformés.

15 12. Procédé de préparation d'un anticorps anti-protéine Tax d'un virus HTLV-1 ou HTLV-2 caractérisé en ce que l'on procède au clonage de lymphocytes B transformés par le virus Epstein-Barr, puis récupère les anticorps attendus sécrétés par lesdits lymphocytes B transformés.

20 13. Procédé de préparation d'un anticorps anti-protéine de régulation d'un virus VIH-1, VIH-2, HTLV-1 ou HTLV-2 caractérisé en ce que l'on prépare ledit anticorps par recombinaison génétique, à partir d'une librairie de phages.

25 14. Procédé de préparation d'un fragment $F(ab')_2$ ou $F(ab)$ d'un anticorps tel que préparé à l'une des revendications 9 à 13, caractérisé en ce que l'on procède à la digestion enzymatique d'un tel anticorps.

15. Un anticorps anti-protéine de régulation d'un virus VIH-1, VIH-2, HTLV-1 ou HTLV-2 obtenu par immunisation d'un mammifère à l'aide d'un composé immunogène tel que défini à l'une des revendications 1 à 4.

30 16. Un fragment $F(ab')_2$ ou $F(ab)$ d'un anticorps tel que défini à la revendication 15.

17. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle

comprend un anticorps tel que défini à l'une des revendications 15 et 16.

18. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend un composé immunogène tel que défini à l'une des revendications 1 à 5, associé à une protéine Gag, Pol ou Env d'un virus VIH-1, VIH-2, HTLV-1 ou HTLV-2.

19. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend un composé immunogène tel que défini à l'une des revendications 1 à 5, associé à une protéine gp120 / gp160, native ou inactivée par traitement physique, chimique, génétique ou immunologique ou à une fraction peptidique de cette protéine, modifiée ou non.

20. Un composé immunogène ayant la formule suivante
HQSLSKQPTSQPRGD ou MEPVDPRLEPWKHPG ou correspondant au Tat natif de HIV1 ou HIV2 après inactivation à l'aide d'un aldéhyde.

21. Une composition vaccinale renfermant
- 15 - un composé immunogène tel que défini à l'une des revendications 1 à 4.

- un composé immunogène qui est une cytokine sous une forme différente de sa forme native et inactivée ou un analogue inactif ou un fragment inactif ou inactivé de cytokine.

- 20 22. Une composition renfermant

- un anticorps anti-protéine de régulation d'un virus VIH-1, VIH-2, HTLV-1 ou HTLV-2

- un anticorps anti-cytokine tel qu'un anticorps anti-interféron α humain.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int: International Application No
PCT/FR 96/00357

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 LDC 6 AF1K20421

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER					PC1/FR 96/00357
IPC 6	A61K39/21	C07K16/10	A61K39/42	A61K47/48	//C12N15/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 A61K C07K

IPC 6	A61K	C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO,A,95 04546 (K. KROHN) 16 February 1995 see examples see claims	1,2,5-7, 9,15
A	WO,A,94 15634 (M. RATH) 21 July 1994 see the whole document	1-7
A	WO,A,91 18454 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) 28 November 1991 see the whole document	1-3,5-7, 9,15,17
A	WO,A,93 22349 (THE INSTITUTE FOR HUMAN GENETICS AND BIOCHEMISTRY) 11 November 1993 see claims see examples	15,20
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 June 1996

Date of mailing of the international search report

18.07.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Nooij, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 96/00357

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 64, no. 2, BALTIMORE, pages 962-965, XP002006890 D. BRAKE ET AL.: "Characterization of murine monoclonal antibodies to the tat protein from human immunodeficiency virus type 1." see abstract see figure 1 see table 2	15
A	--- THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY, vol. 111, no. 3, NEW YORK, NY, ATATS UNIS, pages 1275-1281, XP002006891 D. BRAKE ET AL.: "Identification of an Arg-Gly-Asp (RGD) cell adhesion site in human immunodeficiency virus type 1 transactivation protein, tat." see abstract	15
A	--- WO,A,93 25235 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 23 December 1993 see examples see claims	1,5-7, 18,19
A	--- WO,A,92 14755 (LA JOLLA CANCER RESEARCH FOUNDATION ET AL.) 3 September 1992 see examples I,VIII see claims 1,5-10,16	1-3,5-7, 20
A	--- WO,A,91 15224 (SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION) 17 October 1991 see examples see claims	1-3,5-7
A	--- WO,A,89 12461 (ST. LOUIS UNIVERSITY) 28 December 1989 see examples see claims	1-3,5-8
A	--- FR,A,2 700 169 (TRANSGENE SA) 8 July 1994 see examples see claims -----	1-3,5-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 96/00357

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9504546	16-02-95	AU-B- 7263994	28-02-95
WO-A-9415634	21-07-94	NONE	
WO-A-9118454	28-11-91	NONE	
WO-A-9322349	11-11-93	AU-B- 4116093	29-11-93
		CA-A- 2134080	11-11-93
		EP-A- 0648226	19-04-95
WO-A-9325235	23-12-93	NONE	
WO-A-9214755	03-09-92	AU-B- 1449792	15-09-92
		CA-A- 2101919	15-08-92
		EP-A- 0571549	01-12-93
		JP-T- 6508603	29-09-94
WO-A-9115224	17-10-91	AU-B- 7677891	30-10-91
		EP-A- 0522081	13-01-93
WO-A-8912461	28-12-89	AU-B- 3756789	12-01-90
FR-A-2700169	08-07-94	AU-B- 668441	02-05-96
		AU-B- 5280393	14-07-94
		CA-A- 2112652	05-07-94
		EP-A- 0614980	14-09-94
		JP-A- 6234791	23-08-94

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dep. Internationale No
PCT/FR 96/00357

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 A61K39/21 C07K16/10 A61K39/42 A61K47/48 //C12N15/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 A61K C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO,A,95 04546 (K. KROHN) 16 Février 1995 voir exemples voir revendications ---	1,2,5-7, 9,15
A	WO,A,94 15634 (M. RATH) 21 Juillet 1994 voir le document en entier ---	1-7
A	WO,A,91 18454 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) 28 Novembre 1991 voir le document en entier ---	1-3,5-7, 9,15,17
A	WO,A,93 22349 (THE INSTITUTE FOR HUMAN GENETICS AND BIOCHEMISTRY) 11 Novembre 1993 voir revendications voir exemples ---	15,20
	-/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

27 Juin 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

18.07.96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tél. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Nooijs, F

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De de Internationale No
PCT/FR 96/00357

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 64, no. 2, BALTIMORE, pages 962-965, XP002006890 D. BRAKE ET AL.: "Characterization of murine monoclonal antibodies to the tat protein from human immunodeficiency virus type 1." voir abrégé voir figure 1 voir tableau 2</p>	15
A	<p>--- THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY, vol. 111, no. 3, NEW YORK, NY, ATATS UNIS, pages 1275-1281, XP002006891 D. BRAKE ET AL.: "Identification of an Arg-Gly-Asp (RGD) cell adhesion site in human immunodeficiency virus type 1 transactivation protein, tat." voir abrégé</p>	15
A	<p>--- WO,A,93 25235 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 23 Décembre 1993 voir exemples voir revendications</p>	1,5-7, 18,19
A	<p>--- WO,A,92 14755 (LA JOLLA CANCER RESEARCH FOUNDATION ET AL.) 3 Septembre 1992 voir exemples I,VIII voir revendications 1,5-10,16</p>	1-3,5-7, 20
A	<p>--- WO,A,91 15224 (SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION) 17 Octobre 1991 voir exemples voir revendications</p>	1-3,5-7
A	<p>--- WO,A,89 12461 (ST. LOUIS UNIVERSITY) 28 Décembre 1989 voir exemples voir revendications</p>	1-3,5-8
A	<p>--- FR,A,2 700 169 (TRANSGENE SA) 8 Juillet 1994 voir exemples voir revendications -----</p>	1-3,5-7

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Derivée Internationale No

PCT/FR 96/00357

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9504546	16-02-95	AU-B- 7263994	28-02-95
WO-A-9415634	21-07-94	AUCUN	
WO-A-9118454	28-11-91	AUCUN	
WO-A-9322349	11-11-93	AU-B- 4116093	29-11-93
		CA-A- 2134080	11-11-93
		EP-A- 0648226	19-04-95
WO-A-9325235	23-12-93	AUCUN	
WO-A-9214755	03-09-92	AU-B- 1449792	15-09-92
		CA-A- 2101919	15-08-92
		EP-A- 0571549	01-12-93
		JP-T- 6508603	29-09-94
WO-A-9115224	17-10-91	AU-B- 7677891	30-10-91
		EP-A- 0522081	13-01-93
WO-A-8912461	28-12-89	AU-B- 3756789	12-01-90
FR-A-2700169	08-07-94	AU-B- 668441	02-05-96
		AU-B- 5280393	14-07-94
		CA-A- 2112652	05-07-94
		EP-A- 0614980	14-09-94
		JP-A- 6234791	23-08-94

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

mis Page Blank (uspto)